

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2002-238594

(43)Date of publication of application : 27.08.2002

(51)Int.Cl.

C12P 17/06
A23L 1/20
A23L 1/211
//(C12P 17/06
C12R 1:125)
(C12P 17/06
C12R 1:69)

(21)Application number : 2001-042480

(71)Applicant : MITSUKAN GROUP HONSHA:KK

(22)Date of filing : 19.02.2001

(72)Inventor : SAITO KOEN
FUSHIMI SOSHI
OSHIMA YOSHIFUMI
TSUKAMOTO YOSHINORI

(54) METHOD FOR PRODUCING PHOSPHORYLATED ISOFLAVONE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for producing phosphorylated isoflavone, by which a phosphorylated isoflavone having extremely high water solubility and reduced harsh flavor or a phosphorylated isoflavone-containing soybean material can be safely and efficiently produced.

SOLUTION: A raw material derived from isoflavone-containing soybean or isoflavone itself is cultured together with a microorganism capable of phosphorylating isoflavone, especially a bacterium belonging to the genus Bacillus or a fungus belonging to the genus Aspergillus or treated with a cell body of the cultured microorganism or a phosphorylating enzyme extracted from the microorganism, so that isoflavone is phosphorylated to produce phosphorylated isoflavone.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-238594

(P2002-238594A)

(43) 公開日 平成14年8月27日 (2002.8.27)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テームコード [*] (参考)
C 1 2 P 17/06		C 1 2 P 17/06	4 B 0 2 0
A 2 3 L 1/20		A 2 3 L 1/20	E 4 B 0 6 4
	1/211	1/211	
// (C 1 2 P 17/06		(C 1 2 P 17/06	
C 1 2 R 1:125)		C 1 2 R 1:125)	
審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 10 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-42480 (P2001-42480)

(22) 出願日 平成13年2月19日 (2001.2.19)

(71) 出願人 398065531
株式会社ミツカングループ本社
愛知県半田市中村町2丁目6番地
(72) 発明者 斎藤 孝演
愛知県半田市港本町2-24 協和寮509号
(72) 発明者 伏見 宗士
愛知県知立市弘法町弘法山35-10
(72) 発明者 大島 芳文
愛知県半田市阿原町24-1
(72) 発明者 塚本 義則
愛知県半田市清城町3-3-23
(74) 代理人 100075775
弁理士 戸田 親男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 リン酸化イソフラボンの製造方法

(57) 【要約】

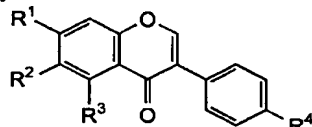
【解決手段】 イソフラボンを含有する大豆由来の原料素材やイソフラボン自体を、イソフラボンをリン酸化する能力を有する微生物、特にバチルス属あるいはアスペルギルス属の微生物と共に培養することにより、あるいは培養した該微生物菌体又は該微生物から抽出したリン酸化酵素で作用させることにより、イソフラボンをリン酸化してリン酸化イソフラボンを製造する。

【効果】 水溶性が著しく高く、不快味が低下したリン酸化イソフラボンあるいはリン酸化イソフラボン含有大豆素材を、安全で効率良く製造することが出来る。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 イソフラボンをリン酸化する能力を有する微生物、該微生物由来のリン酸化酵素、該酵素含有物から選ばれる少なくともひとつを、イソフラボン又はイソフラボン含有物に作用させてイソフラボンのリン酸化を行い、下記化1に示す構造式のリン酸化イソフラボンとすること、を特徴とするイソフラボンのリン酸化方法。

【化1】



(但し、式中、 $R^1 \sim R^4$ は次のことを表わす。

R^1 : 水酸基、リン酸基のいずれか

R^2 : 水素、メトキシ基のいずれか

R^3 : 水素、水酸基、リン酸基のいずれか

R^4 : 水素、水酸基、リン酸基のいずれか

であり、かつ R^1 、 R^2 、 R^4 のいずれか1つ以上がリン酸基である。)

【請求項2】 請求項1において、イソフラボンをリン酸化し、更に、生成したリン酸化イソフラボンを取得すること、を特徴とするリン酸化イソフラボンの製造方法。

【請求項3】 請求項1において、イソフラボン含有物が大豆又は大豆処理物であって、その中に含まれるイソフラボンをリン酸化し、更に、生成したリン酸化イソフラボン含有大豆加工食品を取得すること、を特徴とするリン酸化イソフラボンを含有する大豆加工食品の製造方法。

【請求項4】 微生物が、バチルス (Bacillus) 属に属する細菌又はアスペルギルス (Aspergillus) 属に属する糸状菌であること、を特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】 微生物が、バチルス・サチルス (Bacillus subtilis) 又はアスペルギルス・オリゼ (Aspergillus oryzae) であること、を特徴とする請求項4に記載の方法。

【請求項6】 イソフラボンが配糖体の場合、これを加水分解してアグリコンとし、これをリン酸化すること、を特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】 請求項3～6のいずれか1項に記載の方法で得られたリン酸化イソフラボンを含有する大豆加工食品。

【請求項8】 該大豆加工食品が、大豆由来のエグ味や苦味などの不快味がなく、品質が改良されたものであること、を特徴とする請求項7に記載の大豆加工食品。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、イソフラボンのリン酸化に関するものであり、更に詳細には、本発明は、イソフラボンをリン酸化する能力を有する微生物及び／又は該微生物由来の酵素（酵素含有物も包含される）によりイソフラボンをリン酸化する点を重要な特徴のひとつとするものであって、リン酸化イソフラボンを生化学方法によって製造する新しい方法に関するものである。また本発明は、大豆等イソフラボン含有物中のイソフラボンもリン酸化できるので、リン酸化イソフラボン含有大豆加工食品といった、品質が改良され、新しい機能性食品も提供できるものである。

【0002】

【従来の技術】 大豆は食品原料として広く利用されているが、エグ味や苦味などを呈する不快味成分を多く含んでいることが食味品質の面で古くからの課題となっている。大豆中の主要な不快味成分の一つはイソフラボンであると言われているが (New Food Industry, 36 (10), 17-27, 1994)、近年、イソフラボンはコレステロール低減や骨強化などの健康機能を有することが知られるようになり、大豆などから分離精製したイソフラボンの健康食品素材としての利用法が提案されている。

【0003】 現在までに大豆および大豆発酵食品中には、ダイジン、グリシチン、ゲニスチンあるいはこれらのアグリコンであるダイゼイン、グリシテイン、ゲニステインなど約15種類のイソフラボンが確認されている (食品と開発, 31 (6), 44-47, 1996)。

【0004】 大豆のエグ味や苦味などの不快味を改善する為の方法として、大豆中のイソフラボンを分解、除去または低減化する方法 (特開平5-328929号公報) があるが、このような方法では大豆の健康機能が損なわれてしまう欠点を有していた。そこで、健康機能が発揮される十分量のイソフラボンを含有していても不快味を感じないようにする品質改良方法が求められていた。

【0005】 一方、イソフラボンは水溶性が極めて小さく、食品などへの添加量が制限されたり体内での吸収率が悪くなることなどから、健康機能面で十分な効果が発揮されていないという欠点もあった。

【0006】 そこで、これらのイソフラボンの欠点が改善できれば、大豆加工食品の用途範囲が広がるとともに、健康食品素材であるイソフラボンの用途範囲も広げることができるものと期待される。

【0007】 このような背景において、イソフラボンの不快味を低減させる方法として食品添加物を添加して不快味をマスキングする方法が提案されており、例えばサイクロデキストリンを添加する方法 (特開平9-309902号公報、特開平10-298175号公報) などが試みられてきた。しかし、これらの方法では不快味をある程度は軽減できるが、効果としては未だ不十分であ

(3)

った。また、イソフラボンの水溶性を高める効果も不十分なものであった。さらに、これらの方法では、大豆や大豆素材などのイソフラボン以外の不純物が多量に混在するものについては、不快味の軽減などの効果が得られにくい欠点もあった。

【0008】一方、イソフラボンの化学構造を変換して各種の誘導体とすることにより、エグ味や苦味などの不快味を低減し、水溶性を高めることができることが示されている。例えば、コハク酸が付加されたイソフラボン誘導体（特開平7-70170号公報）、アセチル基が付加されたイソフラボン誘導体（特開平8-291191号公報）やリン酸化されたイソフラボン誘導体（PCT/US99/13160）などがある。これらの誘導体の中では、リン酸化イソフラボンが最も水溶性が高く、不快味を低減する効果に優れていると期待されている。

【0009】しかし、上記のリン酸化イソフラボンの製造方法はいずれも化学合成法であるため、イソフラボンを含む天然素材のままでリン酸化しようとする場合やイソフラボン以外の混合物が混在している場合などでは利用しにくいこと、また化学合成法は、リン酸化イソフラボンを試薬や工業上の用途に使用するには格別の支障はないが、化学合成法は劇物や安全性の懸念される有機溶媒、化学合成助剤などを使用する必要があり、その結果、リン酸化イソフラボンを食品などに利用する上では安全性が懸念されること等の欠点があった。

【0010】すなわち、最も有効なイソフラボン誘導体の一つであると期待されるリン酸化イソフラボンの安全かつ効率的な製造方法を開発することが求められているのである。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、上記した当業界の要望に応える目的でなされたものである。

【0012】

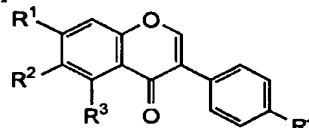
【課題を解決するための手段】本発明は、上記目的を達成するためになされたものであって、特に安全性の面から、イソフラボンのリン酸化に関して化学法ではなく生物学的方法に着目し、イソフラボンの持つ欠点を安全かつ効率的に改良するために、イソフラボンの持つ健康機能は損なわずに、不快味が改良されて水溶性が高められると期待されるリン酸化イソフラボンの微生物による製造方法、あるいは該微生物から得られるリン酸化酵素を用いた製造方法を開発することとした。

【0013】そこで、本発明者らは、イソフラボンを様々な発酵微生物と共に培養し、リン酸化イソフラボンを生成する能力を持つ微生物を広く検索した。その中でイソフラボンの水酸基をリン酸化する能力を有する微生物を初めて見出し、特にバチルス属又はアスペルギルス属の微生物が有効であることを見出して、本発明を完成させることが出来た。

【0014】本発明は、微生物、又は該微生物から抽出したリン酸化酵素を利用し、イソフラボンを利用特性が高い、下記化2に示す構造式のリン酸化イソフラボンに、安全かつ効率良く変換する方法に関する。

【0015】

【化2】



【0016】（但し、式中、 $R^1 \sim R^4$ は次のことを示す。

R^1 ：水酸基、リン酸基のいずれか

R^2 ：水素、メトキシ基のいずれか

R^3 ：水素、水酸基、リン酸基のいずれか

R^4 ：水素、水酸基、リン酸基のいずれか

であり、かつ R^1 、 R^2 、 R^4 のいずれか1つ以上がリン酸基である。）

【0017】本発明方法は、イソフラボンのリン酸化に非常にすぐれており、イソフラボン含有物中のイソフラボン、例えば大豆中に含まれているイソフラボンを大豆から取り出すことなく、大豆中に存在せしめたままイソフラボンをリン酸化して、リン酸化イソフラボン含有大豆を製造することもできるという特筆すべき利点を有しており、また、このように含有物中に含まれているイソフラボンではなく、単離したイソフラボン、つまりイソフラボン自体を直接処理してストレートにリン酸化してリン酸化イソフラボン化合物を直接製造することももちろん可能であって、どのような状態にあるイソフラボンもリン酸化して、リン酸化イソフラボン含有大豆加工食品やリン酸化イソフラボン自体を適宜製造することができる。

【0018】リン酸化するイソフラボンとしては、配糖体タイプのイソフラボン、配糖体部分を除去したアグリコンタイプのイソフラボンのいずれも使用可能であり、次のようなものが非限定的に例示される：ダイジン（Daizin）、グリシチン（Glycitin）、ゲニスチン（Genistin）、これらの6"-O-マロニル誘導体、6"-O-アセチル誘導体、ダイゼイン（Daidzein）、グリシテイン（Glycitein）、ゲニステイン（Genistein）その他。したがって、本発明によれば、これらのイソフラボンをリン酸化して、先の構造式に示したリン酸化イソフラボンを各種製造することができる。

【0019】

【発明の実施の形態】本発明で使用する微生物としては、イソフラボンのリン酸化能を有する微生物であればすべてのものが用いられ、中でもバチルス（Bacillus）属もしくはアスペルギルス（Aspergillus）属の微生物

が好ましい。例えば、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*)、バチルス・プミラス (*Bacillus pumilus*)、バチルス・メガテリウム (*Bacillus megaterium*)、バチルス・セレウス (*Bacillus cereus*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ソーヤ (*Aspergillus sojae*)、アスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus saitoi*) などを挙げることができる。

【0020】更に、例えばバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) ISFK081株 (産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所微生物寄託センターにFERMBP-7439として寄託) やアスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) ISFK029株 (産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所微生物寄託センターにFERMBP-7440として寄託) などが好適な微生物として挙げられる。

【0021】これらの微生物の培養方法は、通常用いられる方法であれば、液体培養法、固体培養法などいずれの方法でも良い。すなわち培養する微生物に適した炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養素を適切な割合で含有した合成培地又は天然培地のいずれでも使用できる。

【0022】リン酸化イソフラボンを取得する場合には、イソフラボンを培地中に100～10000ppm程度添加して培養すれば良い。微生物の培養温度は15～36℃程度、好ましくは30℃前後で実施し、培養時間はイソフラボンが十分にリン酸化される時間であれば良く、通常12～240時間程度、好ましくは50～70時間行えば良い。

【0023】本発明にしたがってイソフラボンをリン酸化するには、上記したようにイソフラボン含有培地で微生物を培養するほか、イソフラボンの存在下、微生物菌体、微生物菌体破砕物等とインキュベートすればよい。また、このように微生物で直接処理するほか、リン酸化酵素を用いて処理してもよい。

【0024】リン酸化酵素を得るには、該微生物の培養上清、又は微生物破砕液上清の硫酸沈澱画分を回収し、緩衝液で脱塩し、必要あればクロマト処理等により更に精製すればよく、該微生物を起源とし、酵素製造の常法にしたがって、抽出、単離、精製すればよい。

【0025】また、リン酸化酵素としては、精製酵素のほか粗製酵素も使用可能であって、各種の該酵素含有物が適宜使用可能である。酵素含有物は、該酵素を含有しているものをすべて包含するものであって、次のものが非限定的に例示される：酵素精製に至る各工程における生成物 (上清、硫酸画分等)、菌体培養物、それから菌体を除去した培養液その他。また、酵素含有物は、その処理物、すなわち、濃縮物、ペースト化物、乾燥物、希釈物等も広く包含するものである。

【0026】本発明は、イソフラボン含有物についても、上記と同様に処理することにより、イソフラボン含

有物中のイソフラボンを酸化してリン酸化イソフラボン含有物を製造するだけでなく、イソフラボン含有物として大豆や大豆破砕物を用い、これに該微生物菌体又は胞子を直接接種して固体培養したり、あるいは液体培養したりして、リン酸化イソフラボン含有大豆加工食品を製造することができる。この場合のリン酸化処理の条件も上記と同様であって適宜設定すればよい。

【0027】本発明において、イソフラボン含有物としては、大豆又は大豆処理物等イソフラボンを含有するものがすべて包含され、大豆処理物としては、大豆を各種処理したものを指し、例えば、蒸煮大豆、大豆煮汁、大豆破砕物、大豆粉末、大豆加工製品 (豆乳、納豆、味噌、醤油等) その他が挙げられる。なお、大豆加工製品の場合にあつては、その原料である大豆類をリン酸化処理し、得られたリン酸化イソフラボン含有大豆加工食品としたものを更にリン酸化することを妨げるものではなく、この場合にはリン酸化処理が再度あるいはそれ以上行われることになる。

【0028】本発明によれば、イソフラボン含有物として例えば蒸煮大豆を用い、これにバチルス属菌又はアスペルギルス属菌の胞子を接種して培養し、納豆又は麴を製造することができるが、この場合、大豆に含まれているイソフラボンが大豆中においてリン酸化することから、本発明によれば、リン酸化イソフラボン含有納豆又は同麴という新規な大豆加工食品を製造することができる。また、更に、この麴を用いるほかは常法にしたがって処理、操作することによって、リン酸化イソフラボンを含有した味噌、醤油その他発酵調味料といった新規な大豆加工食品を製造することもできる。

【0029】この場合、例えば蒸煮大豆、又は大豆破砕物に必要に応じて粉碎した小麦などを添加し蒸煮したものなどに、 $10 \sim 10^6$ 個/g、好ましくは $10^2 \sim 10^3$ 個/g程度のバチルス属微生物の胞子、又はアスペルギルス属微生物の胞子を接種し、12～240時間培養すればリン酸化イソフラボンを含有した納豆や発酵調味料などの大豆発酵食品が得られる。

【0030】また本発明は、バイオリアクターを用いて実施することも可能であって、その場合、固定化微生物菌体や該微生物菌体から抽出した酵素をイソフラボンに作用させリン酸化イソフラボンを得るための方法は、通常の固定化微生物菌体を用いた方法や酵素反応で用いられる方法であればいずれの方法でも良い。例えば、培養菌体を用いる場合は、遠心分離等で集菌した菌体をアルギン酸ゲル等に $10 \sim 10^{12}$ 個/ml、好ましくは $10^3 \sim 10^9$ 個/mlの濃度で固定化させた後、カラム等に充填し、イソフラボンを含んだ溶液、または豆乳などを通液させて変換反応を行うことができる。

【0031】イソフラボンはリン酸化反応をさせる前に、 β -グルコシダーゼで予め処理するなどしてイソフラボンの配糖体部分を除去したアグリコンを使用すると

効率良く変換を行うことができる。この場合の β -グロコシダーゼは、例えば100ppmの中性付近のイソフラボン溶液に1000単位程度の割合で添加し、25～35℃で30～60分間作用させれば良い。また、この前処理は、酸加水分解等化学法によって行っても良い。

【0032】本発明において、固定化微生物菌体に代えて微生物から得られる酵素を固定化したものを用いることもできる。微生物から酵素を得るには、例えば微生物菌体をダイノミル等で破砕後、遠心上清の40～80%の硫酸沈殿画分を回収し、適当な緩衝液で脱塩する方法が利用できるし、培養上清の濃縮液や凍結乾燥物も使用できる。

【0033】培養液または変換反応液からリン酸化イソフラボンを採取するためには、溶媒抽出及びクロマト分画などの通常の方法を用いることができ、例えば以下の方法を用いて採取することができる。

【0034】すなわち、培養液または変換反応液を遠心分離して固形分、および微生物菌体を除去する。上清に60～90%のエタノールを加えて攪拌した後、生成したタンパク質等の沈殿を遠心分離により除去する。遠心上清をロータリーエバポレーターで蒸留した後、乾固物を少量の蒸留水に溶解してpH3～5に調製後、80～90%のエタノールを加え一晩放置する。さらに遠心分離して得られた上清をロータリーエバポレーターで蒸留して得られた乾固物を回収し、リン酸化イソフラボンを得る事ができる。

【0035】そして所望するのであれば、クロマトグラフィー等既知の分離手段によって、リン酸化イソフラボンを各構成成分に分離して、それぞれの成分を単離することもできる。また、食品等に添加使用する場合のよう(表1)

に各成分を単離する必要のない場合には、混合物のままとしてもよい。

【0036】

【実施例】以下に本発明を実施例により説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0037】

【実施例1】(イソフラボンをリン酸化する微生物の検索) 微生物に適応した各種栄養培地5mlにダイゼイン(和光純薬社製)0.5mgを添加して20ml容試験管に入れ、各種微生物を接種後1～2週間培養した。培養液に80%エタノールを3倍量添加し攪拌後、遠心分離して得られた上清を乾固し、さらに蒸留水に溶解した。

【0038】この溶液を0.45 μ mのフィルターで濾過した後、高速液体クロマトグラフィーで成分分析を行った。高速液体クロマトグラフィーは、室温にてカラムCAPCELL PAK C18UG120(資生堂社製; ϕ 4.6 \times 250mm)を使用した。流量1ml/分にて、15%アセトニトリル/0.1%酢酸水溶液から32%アセトニトリル/0.1%酢酸水溶液への直線濃度勾配により溶出させ、溶出液の吸光度(254nm)を測定した。

【0039】ダイゼインのリン酸化物の生成の有無は、7-リン酸化ダイゼインの溶出位置と対比させることにより同定した。このようにしてダイゼインのリン酸化能を有する微生物を検索した結果の一部を表1に示した。なお、リン酸化能については3段階(++:リン酸化し変換効率高い、+:リン酸化する、-:リン酸化しない)で評価した。

【0040】

菌 名	リン酸化能
<i>Bacillus cereus</i>	+
<i>Bacillus megaterium</i>	+
<i>Bacillus pumilus</i>	+
<i>Bacillus subtilis</i>	++
<i>Aspergillus oryzae</i>	+
<i>Aspergillus sojae</i>	++
<i>Aspergillus saitoi</i>	+
<i>Penicillium roquefortii</i>	-
<i>Rhizopus oryzae</i>	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-
<i>Saccharomyces rosei</i>	-
<i>Saccharomycodes capsularis</i>	-
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	-
<i>Hansenula anomala</i>	-
<i>Pichia membranaefaciens</i>	-
<i>Candida versatilis</i>	-

(6)

<i>Lactococcus lactis</i>	—
<i>Lactobacillus lactis</i>	—
<i>Streptococcus lactis</i>	—
<i>Streptococcus mutans</i>	—
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	—

【0041】以上の結果、種々の微生物の内、特にバチルス (*Bacillus*) 属及びアスペルギルス (*Aspergillus*) 属の微生物にのみ、共通してイソフラボンの一種であるダイゼインのリン酸化能があることが初めて確認された。

【0042】

【実施例2】(リン酸化能を有する微生物の同定) 上記の結果からバチルス属及びアスペルギルス属の微生物がダイゼインのリン酸化能を有していることが確認されたが、その中でもさらに優れたリン酸化能を有するものを探索したところ、バチルス属で1株 (ISFK081株) 及びアスペルギルス属で1株 (ISFK029株)

(表2)

形態:	楕円形、1 μ m以下×2～3 μ m
孢子形成:	+
孢子の形:	楕円形
孢子の位置:	亜端立
孢子のう:	非膨出
運動性:	+
酸素に対する態度:	好気性
50℃での生育:	+
55℃での生育:	+
50℃処理による宿菌:	—
グラム染色:	陽性
異染顆粒の有無:	—
カタラーゼ:	+
硝酸塩還元:	+
VPテスト:	+
クエン酸利用合成培地:	+
クエン酸利用クリセテンセン培地:	+
澱粉分解性:	+
合成培地でのレンチナーゼ生産:	—
KG培地でのレンチナーゼ生産:	—
NGKG培地での生育:	—
最小培地での生育:	+
GSP5ファージによる溶菌:	+
グルコースからのガス生産:	+
糖から酸の生産:	
グルコース;	+
蔗糖;	+
マンニット	+
イノシット;	+
ガラクトース;	+
マンノース;	+

の2株を取得することができた。

【0043】ISFK081株については、バージェイズマニュアル・オブ・システムテックバクテリオロジー Vol. 2 (1986年) に従って同定作業を進めた結果、表2に示した結果を得ることができた。その結果、本菌株はバチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) に属する微生物であると同定でき、バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) ISFK081株と命名した。なお本菌株は、産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所微生物寄託センターにFERM BP-7439として寄託されている。

【0044】

キシロース; +
アラビノース; +
乳糖; +

【0045】また、ISFK029株についても、Introduction to Food-Born Fungi (1981年)に従い同定した結果、表3に示す結果が得られ、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) に属する微生物であると同定でき、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) ISFK029株と命名した。なお、本菌株は、産業技術総合研究所生命工学工業技術研究所微生物寄託センターにFERMBP-7440として寄託されている。

【0046】(表3)

1) 生育状況

a) ポテト・デキストロース寒天培地

生育: 良好

分生子柄: 気生菌糸と共に形成

分生子頭の形成: 良好でオリブ黄色、古くなると深黄緑色

集落裏面: 白色

生育温度: 37℃でも生育

b) 麦芽エキス寒天培地

生育: 良好

分生子の形成: 良好

分生子頭の形成: 良好

集落裏面: 白色

生育温度: 37℃でも生育

2) 形態

分生子: 直径5~8μmの球形~亜球形、表面滑面、分生子柄から乾いた連鎖状を形成

分生子頭: 放射状、単列と複列が混在

分生子柄: 長さ4~5mm、無色

頂のう: 直径47~54μm、亜球形

3) 最適生育条件

pH6~7

温度: 25~37℃

【0047】

【実施例3】(リン酸化ダイゼインの調製) バチルス・サチルス (*Bacillus subtilis*) ISFK081株をブイオン液体培地5mlを入れた20ml容試験管に植菌し、37℃にて12時間前培養した。

【0048】この前培養液5mlを、1000ppmのダイゼイン(和光純薬社製)を含む100mlブイオン液体培地入りの300ml容マイヤーに植菌し30℃、36時間培養した。培養液を遠心分離(3500rpm、10分間)して得られた上清に、200mlの9.5%エタノールを添加して発生した沈殿を遠心分離(8000rpm、20分間)により除去した。上清の一部を分取し、実施例1と同様の高速液体クロマトグラフィーにより分析した。分析結果を図1に示す。

【0049】この高速クロマトグラフィーでの分析結果から、原料であるダイゼイン以外に、数種類のリン酸化ダイゼインのピークが確認された。これらのピークの内、最も量的に多かったピーク1の部分に分取し、さらにマスマスペクトル(Fab mas)分析と各種NMR分析を行って表4に示すデータを得た。

【0050】(表4)

(マスマスペクトル分析及びNMR分析のデータ)

Fab mas (m/z) (333.0185-H)

¹H-NMR (600MHz, DMSO, δ) (ppm)、6.77 (2H, d, J=8.5Hz, H-3'), 7.19 (1H, d, J=8.8Hz, H-6), 7.34 (2H, d, J=8.5Hz, H-2', 6'), 7.37 (1H, s, H-5), 7.95 (1H, d, J=8.8Hz, H-5), 8.29 (1H, s, H-2)。

¹³C-NMR (125MHz, DMSO, δ) (ppm): 107.1 (d, J=4.4Hz, C-8), 115.1 (C-3', 5'), 118.3 (C-4a), 118.6 (d, J=5.5Hz, C-6), 122.5 (C-1'), 123.7 (C-3), 126.3 (C-5), 130.1 (C-2', 6'), 153.3 (C-2), 156.8 (C-4'), 157.4 (C-8a), 159.1 (d, J=4.4Hz, C-7), 175.0 (C-4)

³¹P-NMR (162MHz, DMSO, δ) (ppm)

11.05 (s)

【0051】以上の結果から、上記の化合物はR¹がリン酸基となった7-リン酸化ダイゼインすなわち3-(4-Hydroxyphenyl)-7-(phosphonoxy)-4H-1-benzopyran-4-oneであると同定された。

【0052】

【実施例4】(リン酸化ゲニステインの調製) アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) ISFK029株を大豆胚軸を20%含むフスマにて25℃で14日間培養した。培養終了後、培養物100g当たり200mlの蒸留水を加え、4℃にて30分間攪拌した。

【0053】これを遠心分離し、上清を凍結乾燥して酵素粉末を得た。この粉末1gとβ-グルコシダーゼ(シグマ社製)100unitsを100mlの豆乳に添加して攪拌しながら40℃にて1時間保温したところ、リン酸化ダイゼインおよびリン酸化ゲニステインが確認された。

【0054】なお、ここで確認されたリン酸化ゲニステ

インは、表5に示したマスペクトル分析及び各種NMR分析の結果から、R¹がリン酸基となった7-リン酸化ゲニステインすなわち5-Hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-7-(phosphonoxy)-4H-1-benzopyran-4-oneであることが確認された。

【0055】(表5)

(マスペクトル分析及びNMR分析のデータ)

Fab mas (m/z) (349.0132-H)

¹H-NMR (600MHz, DMSO, δ) (ppm)

6.57 (1H, s, H-8)、6.77 (2H, d, J=7.8Hz, H-3', -5')、6.85 (1H, s, H-6)、7.33 (2H, d, J=7.8Hz, H-2', -6')、8.31 (1H, d, H-2)

¹³C-NMR (125MHz, DMSO, δ) (ppm)

98.0 (d, J=5.1Hz, C-8)、103.0 (d, J=5.4Hz, C-6)、105.7 (C-4

(表6)

a)、115.2 (C-3', -5')、121.3 (C-1')、122.4 (C-3)、130.2 (C-2', -6')、154.4 (C-2)、156.9 (C-8)、157.6 (C-4')、161.1 (C-5)、161.3 (d, J=4.9Hz, C-7)、180.6 (C-4)

³¹P-NMR (162MHz, DMSO, δ) (ppm) : 11.27 (s)

【0056】

【実施例5】(水溶性の比較) 実施例3に記載したと同様の操作で得られたリン酸化ダイゼイン、およびダイジン(和光純薬社製)、ダイゼイン(和光純薬社製)500mgに1000μlの蒸留水を加え、25℃にて1夜攪拌した。その後各溶液を0.45μmのフィルターで濾過し、濾液を希釈して高速液体クロマトグラフィーにて分析することにより溶解濃度を求めた。なお、溶解濃度は予め作成しておいたピーク面積と濃度との検量線を基に算出した。結果を表6に示す。

【0057】

試料	濃度 (mg/l)	ダイゼイン対比
ダイジン	19.86	22.3
ダイゼイン	0.89	1
リン酸化ダイゼイン	106.29×10 ³	1.12×10 ⁵

【0058】以上の結果、ダイゼインやダイジンと比較して、リン酸化ダイゼインは数万倍から数10万倍と著しく水溶性が高まることが示された。

【0059】

【実施例6】(抗酸化性の比較) 実施例3に記載したと同様の操作を行い、リン酸化ダイゼインを得た。イソフラボンは抗酸化能を持っており、その抗酸化能が生理機能にも反映していると考えられるためリン酸化ダイゼインの抗酸化力価を測定した。ジエチルチオバルビタール

(表7)

酸法 (J. Food. Sci., 62(3), 526-528, 1997) によりリノール酸の自動酸化に対する抗酸化効果を測定する方法で実施した。即ち1mg/mlのリノール酸溶液中にダイゼイン、リン酸化ダイゼインを各50μM及び500μM濃度になるように添加し、80℃で1時間自動酸化反応をさせた後、酸化反応物量を蛍光測定して求めた。その結果を表7に示した。

【0060】

試験区	蛍光測定値 (Ex515nm-Em555nm)	相対値 (%)
無添加系	772	100
ダイゼイン (50μM)	595	76
ダイゼイン (500μM)	78	10
リン酸化ダイゼイン (50μM)	345	44
リン酸化ダイゼイン (500μM)	41	5

【0061】表7の結果から、リン酸化ダイゼインを添加した場合は、ダイゼインを添加した場合とほぼ同等レ

ベルの酸化物量しか生成せず、抗酸化力価はリン酸化によって低下しないことが確認された。

【0062】

【実施例7】（不快味の改善効果）実施例3に記載したと同様の操作を行いリン酸化ダイゼインを、また実施例4に記載したと同様の方法でリン酸化ゲニステインを得た。得られたこれらのリン酸化イソフラボン誘導体の苦味、エグ味をパネラー10名にて官能評価した。

【0063】すなわち、ダイゼイン、ゲニステイン、リン酸化ダイゼイン、リン酸化ゲニステイン各々について40mgを100mlの炭酸カルシウム溶液（pH10）に溶解して調製し、該水溶液を口に含んで苦味、エグ味を5段階（5：非常に強く感じられる、4：強く感じられる、3：感じられる、2：わずかに感じられる、1：全く感じられない）で官能評価した。評価結果は5段階評価の平均値で示し、表8にまとめた。

【0064】（表8）

イソフラボンの種類	官能評価（平均点）
ダイゼイン	4.5
ゲニステイン	4.2
リン酸化ダイゼイン	1.4
リン酸化ゲニステイン	1.3

【0065】以上の結果、リン酸化イソフラボン誘導体は著しく苦味、エグ味が軽減することが確認された。

【0066】

【発明の効果】本発明によれば、微生物、特にバチルス属またはアスペルギルス属の微生物を用い、安全かつ効率的に、イソフラボンのリン酸基を付与することができ、その結果、イソフラボンに特有の不快味を殆ど解消することができると同時に水溶性を著しく高めることができる。さらに、大豆抽出物やイソフラボンの食品、飲料、栄養補助食品などとしての利用を広げることができる。

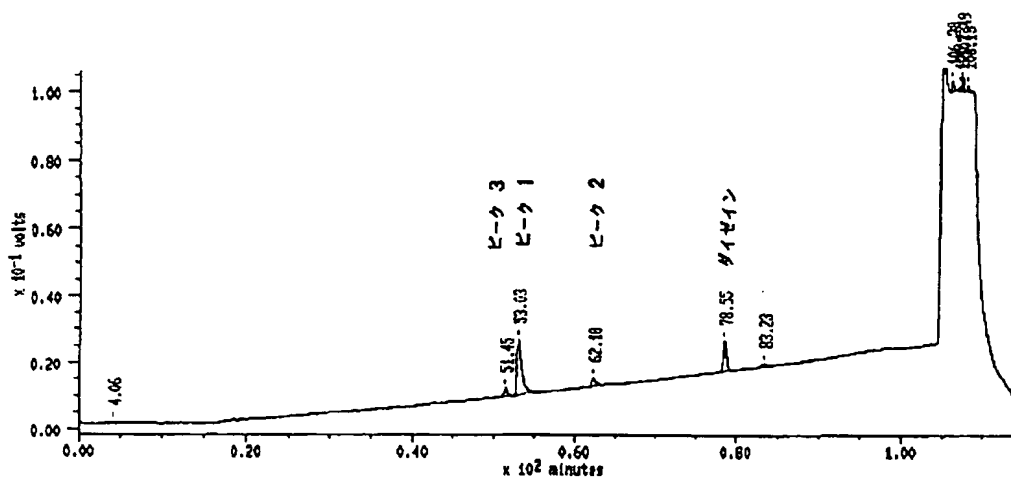
【0067】また、オカラなどの大豆の残渣の中からイソフラボンを抽出分離する際にも、劇物や安全性が懸念される有機溶媒を使用することなく、水溶液に遊離させてリン酸化イソフラボンを獲得することができる。

【0068】リン酸化イソフラボンには吸収性の向上などの改善や新たな健康機能が期待されるため、健康食品素材として、また大豆加工食品や大豆発酵食品への新しい利用の可能性を開くことが期待できる。

【図面の簡単な説明】

【図1】高速液体クロマトグラフィーのチャートを示す。

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷

(C12P 17/06

C12R 1:69)

識別記号

F I

(C12P 17/06

C12R 1:69)

テーマコード* (参考)

F ターム(参考) 4B020 LB24 LC01 LG01 LK03 LK17
LK19 LP18
4B064 AE46 AE63 CA02 CA05 CA21
CB27 CD08 CD22 DA10